



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

FISH를 이용한 국내
사시나무절(*Populus* sect. *Leuce* Duby)
수종에 대한 핵형분석

FISH karyotype analysis of *Populus* sect. *Leuce*
Duby in Korea

2018년 2월

서울대학교 대학원
산림과학부 산림환경학 전공
김 양 길

초 록

사시나무속(*Populus*)의 임목들은 북반구 온대지방의 활엽수 중에서 생장이 우수하며 빠르게 무성생식을 할 수 있기 때문에 임업에서 바이오매스의 대량 생산을 위해 식재된다. 사시나무속은 기내배양이 용이하고 유전체의 크기가 작기 때문에 유전학 연구가 잘 되어 있으며, 임목으로서는 최초로 유전체 해독이 완료되었지만, 세포유전학적인 연구는 부족한 상황이다. 이번 연구에서는 국내 사시나무절(*P. sect. Leuce* Duby)에 속하는 사시나무(*P. tremula* var. *daurica* (Dode) C.K. Schneid.), 은백양(*P. alba* L.), 수원사시나무(*P. tremula* var. *glandulosa* Uyeki), 현사시나무(*P. alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*)에 대해서 45S rDNA 탐침과 5S rDNA 탐침을 이용해 FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)를 수행하여 핵형을 분석하였다. 이를 위해 2017년 4월 경기 수원 국립산림과학원 유전자원부와 경기 어천 사시나무 전시림에서 근삽 시료를 채취하여 근삽과 삽목을 통해 상태가 좋은 뿌리 시료를 확보하였다. 이후 8-hydroxyquinoline 용액으로 전처리한 뒤 세포를 분열 중기에 고정시키고 표본을 제작하였고, DAPI (4',6-diamidino - 2- phenylindole) 염색을 통해 적합한 상을 선정하였다. 이후 45S rDNA 탐침과 5S rDNA 탐침을 이용하여 FISH를 수행한 뒤 핵형을 분석하였다. 분석 결과, 모든 사시나무절 수종은 총 38개의 염색체를 가지며 이배체($2n = 38$)인 것으로 나타났다. 핵형식(karyotype formula)은 사시나무가 $2n = 28m + 6sm + 4st$ (2sat)로 나타났고, 은백양은 $2n = 26m + 10sm$ (2sat) + 2st, 수원사시나무는 $2n = 26m + 12sm$ (2sat), 현사시나무는 $2n = 28m + 10sm$ (2sat)으로 나타났다. 염색체의 총 길이는 사시나무가 $42.91 \mu m$, 은백양이

47.92 μm , 수원사시나무는 39.59 μm , 현사시나무는 50.33 μm 로 측정되었고 개별 염색체 길이의 범위는 사시나무는 1.45~4.69 μm , 은백양은 1.37~5.03 μm , 수원사시나무가 1.26~4.53 μm , 현사시나무는 1.56~5.36 μm 으로 측정되었다. FISH 결과, 모든 수종에서 45S rDNA locus와 5S rDNA locus가 각각 한 쌍씩 염색체의 단완 부위에 나타났으며, 45S rDNA locus는 부속염색체의 인형성 부위에 나타났다. 이러한 점으로 볼 때 국내 사시나무절의 모든 수종이 유사한 핵형을 가지고 있었으며, 핵형의 유사성은 사시나무절 내의 종간교잡을 가능하게 하는 중요한 이유 중 하나로 생각된다. 2번 염색체의 경우 은백양이 4.52 μm , 현사시나무가 3.52 μm , 수원사시나무가 2.81 μm , 사시나무가 2.72 μm 로 측정되었으며, 교잡에 의한 길이변화로 해석된다. 이번 연구는 사시나무절 육종과 유전학 연구의 기초자료가 될 것이며, 유전자지도 작성에 도움을 줄 것이다. 앞으로 연구에서 미완성 된 교잡종에서의 핵형분석이 필요할 것으로 보이며, 다른 절간의 핵형분석도 요구된다.

주요어 : 사시나무절, 사시나무, 은백양, 핵형분석, FISH, rDNA 탐침
학번 : 2016-21456

목 차

초	록	i
List of Tables	iv
List of Figures	v
제1장 서	론	1
제2장 연	구 사	5
1. 사시나무절	수종의 특성과 육종학 연구	5
2. 세포유전학	연구	7
3. 임목의 분자세포유전학	연구	10
제3장 재	료 및 방법	12
1. 공시재료	12
2. 무성증식	13
3. 시료채취	15
4. 고정	16
5. 표본만들기	16
6. FISH (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization)	18
7. 사진 촬영 및 핵형 분석	19

제4장 결 과	20
1. 사시나무의 핵형	20
2. 은백양의 핵형	23
3. 수원사시나무의 핵형	26
4. 현사시나무의 핵형	29
제5장 고 찰	33
인용문헌	37
ABSTRACT	46

List of Tables

Table 1. Karyotype data of <i>Populus tremula</i> var. <i> davidiana</i>	22
Table 2. Karyotype data of <i>Populus alba</i>	25
Table 3. Karyotype data of <i>Populus tremula</i> var. <i> glandulosa</i>	28
Table 4. Karyotype data of <i>Populus alba</i> \times <i>P. tremula</i> var. <i> glandulosa</i>	31

List of Figures

Figure 1. Sample trees of <i>Populus alba</i> and <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i> in the National institute of Forest Science, Suwon, Kyonggy province.	12
Figure 2. Sample trees of <i>Populus tremula</i> var. <i>daurica</i> and <i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i> in the demonstration forest, Hwaseong, Kyonggi province.	13
Figure 3. Root cutting in a pot and shoots sprouting from the root cutting.	14
Figure 4. Propagated individuals by cutting from root cutting and fresh root tip under the stereo microscope	15
Figure 5. FISH and DAPI staining of metaphase chromosomes in <i>Populus tremula</i> var. <i>daurica</i>	21
Figure 6. FISH and DAPI staining of metaphase chromosomes in <i>Populus alba</i>	24
Figure 7. FISH and DAPI staining of chromosomes in <i>Populus tremula</i> var. <i>glandulosa</i>	27
Figure 8. FISH and DAPI staining of chromosomes in <i>Populus alba</i> × <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i>	30
Figure 9. Karyotypic idiogram of <i>Populus tremula</i> var. <i>daurica</i> , <i>P. alba</i> , <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i> and <i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i> based on the measurement of chromosome length and morphology and rDNA signals.	32

제1장 서론

사시나무속(*Populus*)의 임목들은 주로 북반구 온대지방에서 자라는 낙엽성 교목으로서, 생장이 빠르기 때문에 임업에서는 주로 바이오매스(biomass) 생산을 위해 식재된다(노은운 등, 2008). 또한 삼목이나 근삽으로 영양번식을 통해 종자를 통한 번식보다 빠르게 바이오매스를 늘릴 수 있다는 장점이 있다. 그리고 부정아 유도, 캘러스 유도, 원형질체 분리 및 배양, 세포 및 캘러스로부터 식물체 재분화 등의 조직배양 기술이 잘 발달되어 있어서(노은운 등, 2008) 기내배양이 용이하다.

사시나무속은 유전체의 크기가 약 485Mbp/1C로 소나무류보다 50배가 작기 때문에 임목의 모델종(model species)으로 인정받고 활발한 연구가 진행중이다(Bradshaw et al., 2000; Taylor, 2002; 노은운 등, 2008). 특히 2006년에는 *Populus trichocarpa*의 유전체가 모두 해석되었는데(Tuskan et al., 2006), 목본으로서는 최초였고 식물에서는 3번째로 이루어진 것이다. 기내배양이 잘되고 모델종으로서 인정받고 있기 때문에 사시나무속은 유전학적 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 뿐만 아니라 사시나무속은 종간 교잡이 쉽게 일어나서 교잡육종에 관한 연구도 진행되고 있다. 이러한 장점들 때문에 사시나무속은 임목육종에서 중요한 분류군이다.

우리나라에서 사시나무속을 대표하는 종은 사시나무(*P. tremula* var. *davidiana* (Dode) C.K. Schneid.)로서, 수고 20 m, 지름 1 m정도로 자라며 극동러시아, 중국, 일본에도 서식한다(장진성 등, 2011). 사시나무는 분류학적으로 사시나무절(*P. sect. Leuce* Duby)에 속하며, 같은 절에는 유일한 우리나라의 자생종이다. 한편 같은 절에 속하는 은백양(*P. alba* L.)이 우리나라에 1900년을 전후하여 도입되었으며, 수원에서 사시나무와

자연교잡하여 생긴 은사시나무(*P. ×tomentiglandulsa* T.B. Lee)가 1950 년대에 보고되었다. 또한 은사시나무 중에서 사시나무와 가까운 개체로 여겨지는 수원사시나무(*P. tremula* var. *glandulsa* Uyeki)와 은백양을 인공교잡하여 선발한 현사시나무(*P. alba* × *Populus tremula* var. *glandulsa*)가 존재한다(장진성 등, 2011; 장진성, 2014).

사시나무는 척박한 산지에서 잘 자라는 반면 은백양은 수분이 풍부한 평지에서 우수한 생장을 보이며, 현사시나무는 둘의 장점을 모두 가지는 잡종강세(heterosis)를 보이기 때문에 이들 모두 육종학적 가치를 지니며 산림녹화 초기에 속성수로서 많이 식재되었다. 현재 국토녹화에 성공한 상황에서, 사시나무절 임목의 육종연구는 척박한 환경을 조림하는 것보다는 지구온난화에 대한 바이오매스 생산이나 간척지 등 특수환경에서의 조림, 그리고 임목의 모델종으로서 유전학적인 연구가 필요한 상황이다. 특히 임목의 특성상 일반적인 선발육종으로는 오랜 시간과 많은 비용이 소모되기 때문에 유전학적인 방법을 통해 이를 절약하여야 한다.

최근 우리나라에도 유전체학(genomics) 분야의 발전과 함께 임목의 유전체 해독사업이 ‘포스트게놈 신산업 육성을 위한 다부처 유전체 사업’으로 추진되고 있다. 산림분야는 사시나무, 밤나무 및 소나무의 표준유전체 작성, 전사체와 대사체를 이용한 기능유전체 연구, 유전연관지도 작성과 유전체 육종집단 조성 등의 연구가 수행되고 있는데, 이러한 유전체 연구를 위해서는 각 수종별 핵형 분석 및 DNA 표지자(marker) 개발 등 선결 과제가 필요하게 된다. 하지만 사시나무절에 대한 세포유전학에 대한 연구는 부족한 상황이며, $2n = 38$ 이라는 염색체 수와 단순한 핵형 분석만 되어 있는 상태이고 FISH (fluorescence *in situ* hybridization)를 이용한 핵형분석이나 물리지도(physical map) 작성이 부족한 상태이다(

Prado et al., 1996; Liwang et al., 2005; Islam-Faridi et al., 2009).

세포유전학은 염색체를 연구하는 학문으로서 기존에는 단순히 염색체의 길이와 형태만 연구했었지만, 1980년대 후반 FISH 기술이 개발되어 새로운 지평을 열었다(Levsky & Singer, 2003). FISH는 특이적인 DNA 염기서열을 가진 탐침(probe)을 사용해서 염색체 상에서 해당 염기서열의 위치를 확인할 수 있는 방법이다. 식물에는 FISH가 최초로 1989년도에 도입되었고(Schwarzacher et al., 1989; Yamamoto & Mukai, 1989) 분류학에서 핵형 분석을 이용해 유전체를 비교하거나 육종학에서 유전자의 물리지도(physical map)를 작성할 때 사용되고 있다(Jackson et al., 1998). 기존에 유전자지도로 사용하는 연관지도(linkage map)는 물리지도와는 다르기 때문에 FISH를 이용하여 실제 염색체와 연결시키는 작업이 필요하다.

FISH를 이용한 핵형분석에서 가장 많이 사용되는 탐침은 리보솜(ribosome)의 유전정보를 가지고 있는 45S rDNA와 5S rDNA이다. 이들은 모든 식물에 존재하고 신호가 선명한 편이기 때문에 FISH를 이용한 핵형분석을 처음으로 사용할 때 이용한다(Castilho & Heslop-Harrison, 1994; Benabdelmouna & Darmanay, 1997; D'hont et al., 1998; Hasterok et al., 2001; Kim & Lee, 2007).

사시나무속 임목들의 FISH를 비롯한 세포유전학적 연구는 거의 되어 있지 않다. 사시나무와 은백양을 비롯한 사시나무속은 중국에서 핵형분석이 된 바 있지만(Liwang et al., 2005; Shougong et al., 2005) FISH를 사용하지 않고 염색체의 핵형식만 밝혀진 상태다. 사시나무속의 FISH 연구는 Prado et al이 1996년에 사시나무 속 5개종에 대해 수행한 것이 처음이고 그 이후에 Islam-Faridi et al.이 2009년에 *P. trichocarpa*의

FISH를 수행한 것이 전부다. 이외에도 *P. tremula* L.의 1번 염색체가 microdissection으로 분리한 것이 성공했다는 보고가 있을 뿐이다. 사시나무절을 비롯한 임목의 FISH 연구는 핵형분석을 통해 종간의 근연관계를 보여줄 수 있을 뿐만 아니라, 육종을 하는데 있어서 중요한 유전자를 실제 염색체 상에 표시할 수 있는 물리지도를 작성할 수 있기 때문이다 (Jackson et al., 1998).

따라서 이번 연구는 사시나무절의 육종과 유전체 연구의 기초를 쌓기 위해 사시나무 절에 속한 사시나무, 은백양과 그 교잡종인 수원사시나무, 현사시나무를 45S rDNA와 5S rDNA를 탐침으로 사용한 FISH를 수행하여 기본적인 핵형을 밝히고, 이들의 핵형을 비교하고자 한다. 이를 통해서 같은 절에 속한 모수 은백양과 화분수 사시나무, 그리고 그 교잡종간의 핵형을 비교하여 실제로 핵형이 유사한지 확인하고 사시나무절의 핵형을 제시하여 세포유전학 연구의 기초자료를 제공하고자 한다. 이는 향후 사시나무절의 육종에 응용 가능한 유전지도 작성에 도움을 줄 것이다.

제2장 연 구 사

1. 사시나무절 수종의 특성과 육종학 연구

사시나무속(*Populus*)은 버드나무과(*Salicaceae*)에 속하며 6개의 절(section), 약 30종이 있다(Cervera et al., 2005). 본래 사시나무속은 사시나무절(*Leuce*), 미루나무절(*Aigeiros*), 황철나무절(*Tacamahaca*), 그리고 국내에는 존재하지 않는 *Leuroides*절, *Turanga*절로 5개의 절이 있었다(FAO, 1980). 하지만 1990년대 중반에 *Abaspo*절이 추가되서 현재는 6개절로 분류하고 있다(Dickmann, 2001). 그 중에서 사시나무절은 은백양이 속하는 *Albidea*아절과 사시나무 등이 속하는 *Trepidae*아절로 분류된다. 절 내에서는 자연교잡이 잘 이루어지지만 절간에는 미루나무절과 황철나무절, 미루나무절과 *Leuroides*절, *Leuroides*절과 황철나무절간에서만 일어난다(구영본 등, 2010).

국내의 사시나무 절에는 자생종인 사시나무(*P. tremula* var. *daurica* (Dode) C.K. Schneid.)와 도입종인 은백양(*P. alba* L.), 그리고 이들의 교잡종들이 존재한다. 사시나무를 *P. tremula*와 분리된 하나의 종으로 보는 견해도 있지만(Fu et al., 2001) 형태, 유전적 특성이 비슷하여 동일종으로 볼 수 있어(Eckenwalder, 1996) 추가적인 연구가 필요하다. 은백양과 사시나무의 자연교잡종은 은사시나무(*P. ×tomentiglandulosa* T.B. Lee)라고 한다. Uyeki가 여기산에서 발견한 수원사시나무(*P. tremula* var. *glandulosa* Uyeki)는 은사시나무 중에서 사시나무에 가까운 개체로 여겨지며, 전체가 발달한다는 특징을 가지고 있다(Uyeki, 1925; Son & Yim, 1979; 손두식 등, 1994). Uyeki는 수원사시나무를 *P. glandulosa*

Uyeki라고 명명했지만 후동명이므로 사용할 수 없다(장진성 등, 2011; 장진성, 2014). 은백양과 수원사시나무를 인공교잡으로 육종한 교잡종을 현사시나무(*P. alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*)라고 한다. 분류학적으로는 수원사시나무와 현사시나무를 모두 은사시나무로 통칭할 수 있지만, 현사시나무는 다른 개체에 비해 우수한 형질을 가지고 있기 때문에 육종학적으로는 이들을 구별한다.

은백양은 19세기 말을 전후하여 국내에 도입된 것으로 보이며 공원수로 많이 식재되었으며, 그 과정에서 사시나무와 자연교잡되어 수원사시나무가 생긴 것으로 보인다. 1950년대 현신규박사에 의해 은백양과 수원사시나무의 인공교잡으로 탄생한 현사시나무는 1호부터 4호까지 육성되었다. 3호는 1호 중에서 가장 성장과 형질이 뛰어난 개체를 선발하여 클론 증식된 단일 클론이다. 4호는 2호 중에서 4개의 클론을 선정한 것이다.

현사시나무의 적지는 점질토가 많은 미사질 양토로 토심이 30 cm 이상의 깊은 산록이나 계곡에서 생장이 우수하다. 다른 사시나무속에 비해 입지적응력이 강하고 맹아력이 강하다. 하지만 현사시나무는 1, 2차 산림녹화기간 중 대량으로 보급되면서 많은 문제점이 발생했다. 우선 품종이 고정되기 전에 불량 품종이 보급되고 적지적수가 되지 못했다. 사시나무의 육종은 1980년대 초반부터 하천법에 의해 하천변에 나무를 식재하는 것이 금지되면서 조림적지를 상실당한 이태리 포플러(*P. ×euramericana* (Dode) Guinier)를 대체하기 위해 시작되었다. 2005년 Koo et al.가 우수한 클론 7개를 선정했고 대량증식기술이 개발되었다. 사시나무는 다른 사시나무속과는 달리 계곡뿐만 아니라 산 정상상을 제외하면 어디서나 생장이 가능하여 식재 범위가 넓다는 장점이 있다(우관수 등, 2005).

2. 세포유전학 연구

세포유전학(cytogenetics)은 생물의 유전학적 측면을 세포학적인 시각에서 밝히려는 학문이다. 주로 세포의 핵(nucleus) 내부의 염색체(chromosome)를 연구하며 염색체의 구조, 수, 형태 등을 다룬다. 1800년대 중반부터 현미경으로 염색체를 관찰하기 시작했지만 각각의 염색체를 구별할 수 없었고, 1950년대에 들어서 여러 가지 기법들이 개발되어 염색체 분석이 시작되었다. 이를 가능케 했던 주요 기법에는 콜히친(colchicine)등으로 세포분열(mitosis)의 중기(metaphase)에 고정(fixation)해서 염색체를 농축시켜 관찰하기 좋게 만드는 방법과 저장액을 사용하여 세포를 부풀려 터지게 해서 염색체가 잘 퍼지도록 하는 방법이 있었다(주경웅 & 김윤식, 2006).

염색체의 관찰은 보통 염색질(chromatin)이 농축되는 중기단계에서 이루어진다. 중기 이외의 세포주기에서는 염색질이 뭉쳐있지 않고 흩어져 있기 때문에 서로 다른 염색체 끼리 구별이 가지 않고, 염색체의 형태가 비정형이라서 형태를 파악할 수 없다. 염색체의 염색은 주로 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 용액으로 이뤄지는데, DAPI는 A-T 염기쌍에 특이적으로 결합해서 자외선(300~400 nm)을 받으면 푸른 형광(400~500 nm)을 띤다(Kapuscinski, 1995).

세포분열 중기의 염색체 형태는 총 길이와 동원체(centromere)의 위치로 나타낼 수 있다. 중기의 염색체를 관찰하여 개체나 분류군의 전체 염색체의 수, 형태, 크기의 특징을 기술한 것을 핵형(karyotype)이라고 한다(Jürgen, 1980). 핵형은 환경에 따른 변화가 적고 종에 따라 일관된 특성을 가지기 때문에 분류학, 계통학적으로 의미를 가지며 유전체 연구에도 중요하다(김수영, 2011).

염색체의 형태는 동원체의 위치에 의해서 분류하는데, 이러한 분류는 1928년 Wilson에서부터 시작된다. 그는 염색체에서 동원체가 중심부에 있는 경우를 중부(median), 말단부에 있는 경우를 단부(terminal)로 분류하였으며, 그 사이에 있는 경우에는 차중부(submedian)와 차단부(subterminal)로 나누었다. 이 분류법은 1964년 Levan et al.에 의해 수학적으로 나뉘지게 된다. 염색체의 장완(long arm)의 길이를 l , 단완(short arm)의 길이를 s 이라고 하면 arm ratio는 l/s 로 구해지며, arm ratio가 1~1.7인 경우 중부염색체(m; median chromosome), 1.7~3.0인 경우 차중부염색체(sm; submedian chromosome), 3.0~7.0인 경우 차단부염색체(st; subterminal chromosome), 7.0 이상인 경우 단부염색체(t; terminal chromosome)로 정의되었다. 이 분류법은 현재까지도 쓰이고 있으며, 주로 핵형식(karyotype formula)으로 사용된다. FISH기술은 현재 flow cytometry 기술과 결합하여 FISH-Flow라는 새로운 기술로 발전하였으며, 슬라이드를 준비하는 복잡한 과정 없이 빠르게 많은 양의 세포를 관찰할 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다(Arriguucci et al., 2017).

세포유전학에 분자유전학을 접목시킨 세포유전학을 분자세포유전학(molecular cytogenetics)라고 한다. 분자세포유전학에서 대표적인 FISH(fluorescence *in situ* hybridization) 기법은 특정한 염기서열과 상보적인 DNA에 형광물질을 붙인 탐침(probe)을 염색체에 혼성화(hybridization)시켜서 염색체 상에 상보적인 서열의 위치를 확인하는 방법이다. 혼성화의 개념을 염색체에 응용한 것은 1970년 Pardue & Gall이 쥐의 부수염색체(satellite chromosome)를 염색한 것이 최초이다. 현재에 사용되는 biotin, digoxigenin을 이용하는 것은 1986년 Pinkel et al.에 의해 도입되었다. FISH는 의학계에서 인간의 염색체이상을 판별하는데 이용하고 있고 생물학에서는 모든 생물에 공통적인(universal) 탐침을 이용하여 핵형

을 분석하는데 쓰이고 있다(세포유전학 편찬위원회, 2011). FISH 신호는 최소 2.4kbp의 염기서열만큼 혼성화가 되어야 감지할 수 있으므로, 반복 서열 또는 긴 상보적 염기서열의 탐침이 필요하다(Danilova & Birchler, 2008).

일반적으로 핵형분석에 가장 많이 쓰이는 FISH 탐침은 45S rDNA와 5S rDNA 탐침이다. 45S rDNA는 18S, 5.8S, 25S rRNA(ribosomal RNA)를 암호화하는 유전자이며 5S rDNA는 5S rRNA를 암호화하고 있는 유전자이다. 두 유전자는 FISH 탐침으로 가장 많이 사용하는데, 그 이유는 식물 종간에 염기서열이 잘 보존되어 있는 부분이 존재하고 반복 서열이라서 신호를 감지하기 좋기 때문이다(Ribeiro et al., 2008). 또한 분류군마다 염색체상에 다른 위치에 존재하며 개수도 달라지기 때문에 핵형 분석이나 유전체 비교에 유용한 탐침으로 사용된다(Castilho & Heslop-Harrison, 1994; Benabdelmouna & Darmanay, 1997; D'hont et al., 1998; Hasterok et al., 2001; Kim & Lee, 2007).

3. 임목의 분자세포유전학 연구

임목의 분자세포유전학은 활엽수보다는 침엽수에 초점이 맞춰져 있다. 침엽수의 유전체 크기는 평균 18,536Mbp/1C, 반수체의 평균 염색체 수가 12개인데 반해서, 활엽수의 유전체 크기는 평균 788Mbp/1C, 반수체의 평균 염색체수가 28개로, 침엽수가 활엽수보다 염색체의 수가 적고 크기가 커서 상대적으로 연구가 용이하기 때문이다(Ribeiro et al., 2008).

45S rDNA와 5S rDNA를 탐침으로 하는 FISH는 소나무과(Pinaceae), 나한송과(Podocarpaceae), 소철과(Cycadeceae)에 속하는 침엽수에서 주로 행해졌다(Tagashira & Kondo, 2001; Murrasy et al., 2002; Siljak-Ya-kovlev et al., 2002; Cai et al., 2006). 가장 많이 연구된 속은 소나무속(*Pinus*)으로, 20종에 대한 핵형 비교 결과 rDNA locus가 종마다 큰 다양성을 보인다는 것을 밝혀냈으며(Cai et al., 2006) 전나무속(*Picea*)에서도 동일한 결과가 나타났다(Vischi et al., 2003). Shibata et al. (2016)은 소나무속 26종에 대해서 45S rDNA와 5S rDNA를 탐침으로 이용한 FISH를 수행하였다. 활엽수종에 대한 연구는 많지 않았지만 자작나무속(*Betula*)과 사시나무속, 참나무속(*Quercus*) 등에서 이루어졌다(Prado et al., 1996; Zoldos et al., 1999; Anamthawat-Jónsson, 2004; Islam-Faridi et al, 2009). 참나무속의 종들은 rDNA locus의 개수에 차이가 없었다(Ribeito et al., 2008).

우리나라에서는 과거부터 임목에 대한 전통적인 세포유전학연구는 있어왔지만(김수인, 1988; Li et al., 2008) FISH를 이용한 분자세포유전학 연구는 많지 않은 편이다. 김수영 & 김찬수(2009)가 솔비나무와 다릅나무를 45S rDNA와 5S rDNA 탐침을 이용하여 FISH를 한 결과, 45S rDNA locus는 모두 1쌍이 발견되었지만 5S rDNA loci는 솔비나무가 2

쌍, 다릅나무는 4쌍으로 차이를 보였다. 그리고 김수영 등이 2012년 벚나무속(*Prunus*) 5종(벚나무, 산벚나무, 올벚나무, 사옥, 왕벚나무)에 대해 rDNA FISH를 수행한 결과 45S rDNA는 공통적으로 3쌍이 관찰되었고 5S rDNA는 올벚나무를 제외하고 2쌍이 발견되었다. 올벚나무는 5S rDNA locus가 1쌍만 발견이 되어 다른 종과 차이를 보였다. 특이할만한 점은 왕벚나무의 경우 45S rDNA는 안정적으로 관찰이 되었으니 5S rDNA는 결실 또는 비상동적으로 관찰이 되었는데 이러한 결과는 야생종보다는 재배종에서 드물게 관찰된다고 고찰하였다.

사시나무속에 대한 분자세포유전학 연구는 Prado et al. (1996)과 Islam-Faridi et al. (2009)이 있다. Prado et al. (1996)은 45S rDNA 탐침을 이용한 FISH로 은백양에서 1쌍의 45S rDNA locus, 양버들(*P. nigra*)와 미루나무(*P. deltoides*)에서 2쌍, 발삼포플러(*P. balsamifera*)와 이태리 포플러에서 3쌍이 존재하는 것을 확인하였다. Islam-Faridi et al. (2009)는 *P. trichocarpa*에 대해서 45S rDNA와 5S rDNA 탐침을 이용한 FISH를 수행하였으며 이를 통해 각각 2쌍과 1쌍의 loci가 서로 다른 염색체에 존재한다는 것을 밝혀냈다. 또 애기장대속(*Arabidopsis*)의 말단 반복서열(telomere repeat sequence) 탐침이 모든 염색체의 말단에 혼성화되는 것을 관찰하였다. 마지막으로 2개의 연관그룹(linkage group)의 유전염기서열을 바탕으로 선정된 6개의 BAC clone을 이용한 FISH를 통해 각각의 염색체를 찾아내고 지도화하였다. 하지만 두 연구 모두 핵형 분석은 실패했는데, 사시나무의 유전체가 매우 작고 염색체 개수가 많아서 좋은 상을 얻기 어렵기 때문으로 보인다. 일반적으로 사용되는 중기 염색체외에, 후사기(pachytene)의 염색체를 준비하는 방법에 대해서 연구된 바(Xin et al., 2016)가 있지만, 후사기 염색체를 이용한 사시나무의 FISH는 이루어지지 않은 것으로 보인다.

제3장 재료 및 방법

1. 공시재료

2017년 4월 7일에 경기도 수원시에 위치한 국립산림과학원 유전자원부에 식재된 은백양, 수원사시나무의 뿌리를 채취했고, 2017년 4월 12일에 경기도 화성시 어천에 위치한 사시나무 전시림에서 사시나무와 현사시나무의 뿌리를 채취하였다. 사시나무는 모수 전녀4 클론과 화분수 봉현4 클론의 교배차대인 어천 1-99-48-7번 개체를 사용하였다. 현사시나무는 현사시 3호 클론인 어천 3-현사시3-1번 개체를 사용하였다. 수원사시나무는 유전자원부 구분관 앞에 위치한 개체를 사용하였다. 은백양은 산림 유전자원부 구분관 뒤편에 위치한 개체를 사용하였다.



Figure 1. Sample trees of *Populus alba* (left) and *P. tremula* var. *glandulosa* (right) in the National institute of Forest Science, Suwon, Kyonggy province.



Figure 2. Sample trees of *Populus tremula* var. *daurica* (left) and *P. alba* × *P. tremula* var. *glandulosa* (right) in the demonstration forest, Hwaseong, Kyonggi province.

2. 무성증식

2.1 근삽

뿌리 샘플을 얻는 가장 좋은 방법은 종자발아이지만, 사시나무절의 종자에서 발아해 자라난 뿌리는 너무 가늘어서 실험에 사용하기 부적합했고, 종자를 확보하는데 어려움이 있었다. 따라서 사시나무절의 뿌리 샘플의 확보를 위해 근삽을 실시하였다. 근삽의 방법은 구영본 등(2010)을 참고하였다. 근삽은 4월 초에 이루어졌으며, 나무의 줄기와 연결되어 있는 뿌리 중 직경이 5~10 cm인 부분을 20~30 cm 길이로 절단하였다. 채집한 뿌리는 즉시 물을 넣어서 습기가 확보된 지퍼백에 보관하여 실험

실로 이동하였다. 화분에 상토를 채우고 뿌리 윗부분이 흙 위로 드러나도록 심은 뒤(Figure 3), 비닐로 윗부분을 덮어서 습기가 유지되도록 하였다. 마지막으로 화분을 성장상에 두고 형광등을 8시~24시까지 켜고, 물은 2~3일에 한 번씩 흠뻑 주었다.

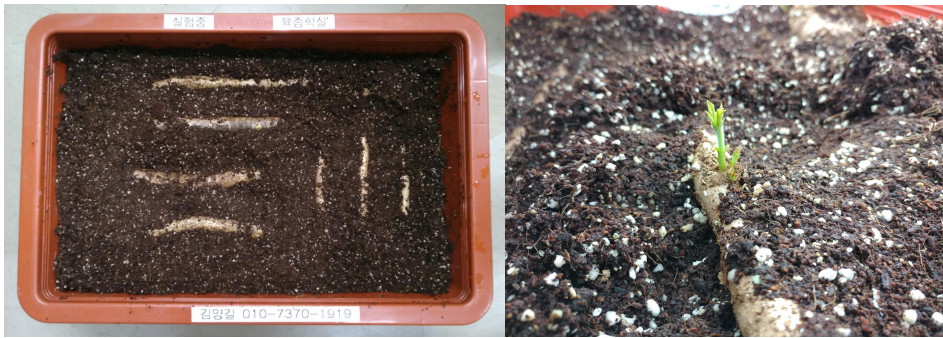


Figure 3. Root cutting (left) in a pot and shoots sprouting (right) from the root cutting.

2.2 삽목

삽목의 방법은 구영본 등(2010)을 참고하였다. 근삽 후 3~4주 후에 신초가 뿌리에서 자라나기 시작했다(Figure 3). 신초가 15~20 cm 정도로 자랐을 때, 기부에서 2~3 cm 정도 남겨두고 전정가위로 잘라냈다. 잘라낸 신초를 3~5 cm로 3~5등분하여 절단부에 발근제를 바르고 상토를 채운 작은 화분이나 포트에 심었다. 삽목의 윗부분에 잘라낸 자리는 라텍스 유제(latex emulsion)를 발라서 마무리했다. 근삽과 마찬가지로 습기를 유지하기 위해 철사로 모양을 유지시킨 비닐을 씌웠다. 삽목한 개체들을 성장상에 두고 형광등을 8시~24시까지 켜고, 물을 저면관수로 주었다. 삽목한 개체가 많이 자라서 비닐이 좁아질 때에는 비닐을 제거

하였고, 필요한 경우 다시 삼목을 해서 묘고를 적절히 유지 시켰다.

3. 시료 채취

시료 채취 방법은 Waminal et al. (2012)을 참고하였다. 발근된 삼목 개체의 뿌리 정단부를 세포분열이 가장 활발한 시기인 9~10시에 잘랐다. 이때 뿌리 정단부는 가능한 두껍고 초록색이나 흰색을 띄는 것을 선정하여 채집하였다. 다른 뿌리를 자르는 동안 미리 잘라낸 뿌리는 얼음으로 차갑게 유지된 물에 넣어서 냉장을 유지했다. 채취한 뿌리 정단부를 붓으로 훑이나 이물질을 제거했다.



Figure 4. Propagated individuals (left) by cutting from root cutting and fresh root tip (right) under the stereo microscope (45×). Bar is 1mm.

4. 고정

고정방법은 Kato et al. (2004)과 Wanimal et al. (2012)를 참고하였다. 채취한 뿌리를 8-hydroxyquinoline 용액(0.002M)이 들어 있는 10 mL vial에 넣었다. 그리고 Waterbath에서 12℃, 5시간 동안 보관했다. 그 후, 8-hydroxyquinoline을 버리고 카르누아 용액(Carnoy's solution; ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1, v/v)으로 2번 세척했다. 그런 다음 카르누아 용액으로 상온에서 2시간 보관했다. 마지막으로 카르누아 용액을 버리고 70% 에틸 알코올 용액으로 2번 세척 한 다음 4℃ 냉장고에 보관했다. 고정된 뿌리는 가능하면 1달 이내로 사용하였다.

5. 표본 만들기

표본 만드는 방법은 Kato et al. (2004)와 Wanimal et al. (2012)을 참고하였다. 고정된 뿌리를 차가운 증류수에 10분간 보관하였다. 그 다음 바늘, 핀셋, 메스, 실체현미경(Nikon, SMZ445, 8-35×)을 이용해서 뿌리 정단부의 세포분열이 활발한 부분만 잘라내었다. 이를 위해서 우선 뿌리 둘레의 각질부분을 제거하였고, 부리 끝이 갈색인 경우 죽은 세포들이므로 제거하였다. 뿌리 정단부에서 세포분열이 활발한 부위는 다른 부분과 달리 하얗고 진한 부위로서 가능하면 그 부분만을 잘라내었다.

잘라낸 부분은 2-4조각을 e-tube에 넣었고, e-tube에는 각각 CP용액(Cellulase & pectolyase solution; 1% pectolyase (Sigma, Japan)과 2% Cellulase (MB Cell, Korea)) 40 µL씩 넣었다. 그리고 항온배양기(incubator)에서 37℃, 2시간을 보관하여 효소를 활성화시켜서 세포벽이 분해되도록 하였다. 2시간 경과 후 파이펫으로 CP용액을 제거하고 증류

수 40 μL 을 넣고 얼음에 5분간 보관했다. 그리고 물을 파이펫으로 제거하고 카르누아 용액 50 μL 를 넣은 뒤 바늘로 뿌리 샘플을 잘게 쪼갬다. 그 다음 20초동안 vortex하고 5분 동안 얼음에 보관하였다. 그리고 5000 rpm, 5분간 원심분리를 해서 세포들을 가라앉혔다. 그리고 e-tube를 invert하여 카르누아 용액을 버리고 90% 아세트산 용액(glacial acetic acid : ethanol = 1 : 3, v/v) 20 μL 를 넣고 tapping으로 세포들을 용액에 섞었다. 마지막으로 원심분리를 잠시 수행해서 용액들을 가라앉혔다.

슬라이드 글라스(76 mm×26 mm×1 mm)를 e-tube 1개 당 2개씩 준비해서 water bath에 놓고 물방울이 맺힐 때까지 기다렸다. 습기가 적절히 생긴 슬라이드 글라스에 세포가 들어있는 용액을 10 μL 씩 파이펫으로 지그재그로 퍼트렸다. 그 다음 40℃ 오븐에서 말렸다. 암실에서 커버 글라스(24 mm×50 mm) 위에 DAPI 용액(4',6-diamidino-2-phenylindole; DAPI stock solution (Roche, Germany) : 2×SSC 용액 = 1 : 99, v/v) 40 μL 를 떨어뜨렸다. 슬라이드 글라스를 뒤집어서 커버 글라스와 붙이고 DAPI 용액이 전부 퍼질 때까지 기다렸다. 그리고 형광현미경(Olympus BX51, 100×, 400×, 1000×)을 이용해서 관찰하였다. 400배율을 이용해 슬라이드 글라스의 왼쪽 위 끝에서부터 이동하면서 빠뜨리는 부분이 없이 관찰하였다. 좋은 상이 있는 경우 여분의 슬라이드 글라스에 같은 위치를 표시하는 mapping 작업을 수행하고 FISH를 진행하였다.

6. FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

FISH에 사용한 45S rDNA 탐침과 5S rDNA 탐침의 서열은 Waminal et al. (2016, in submission)이 설계한 대로 제작되었다. 45S rDNA 탐침은 AlexaFluorTM-5-dUTP (Invitroden, USA)로 labeling 하였고, 5S rDNA 탐침은 Diethylamino Coumarim-5-dUTP (Invitroden, USA)로 labeling 하였다. 염색체가 잘 관찰되는 상이 존재하는 표본을 선정하여 FISH를 수행하였다. 암실 환경에서 e-tube에 FM 32 μ L, 5S rDNA 탐침 2 μ L, 45S rDNA 탐침 2 μ L, 텔로미어(telomere) 2 μ L, 증류수 2 μ L를 넣어서 총량 40 μ L의 염색 용액을 준비한 다음, tapping으로 혼합하고 원심분리기로 가라앉힌 뒤 얼음에 꽂아 두었다.

커버 글라스를 알코올로 닦은 다음 40 μ L를 떨어뜨리고 압착해서 염색 용액이 퍼지게 하였다. 그 다음 thermobrite로 80 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하였다. 그리고 습기찬 공간, 상온에서 30분 동안 혼성화(hybridization)를 했다. 그리고 커버 글라스를 제거한 뒤 washing과정을 거쳤다. 2 \times SSC 용액에서 10분간 상온에서 Laboshaker D600 (Labogene, Korea)으로 흔들었고, 2 \times SSC 용액에서 25분간 42 $^{\circ}$ C water bath, 2 \times SSC 용액에서 5분간 상온에서 Laboshaker D600로 흔든 다음, 에틸 알코올 70%, 90%, 100% 용액에 각각 3분씩 처리 하였다. 마지막으로 암실 조건에서 기건 시킨 다음, 커버 글라스(24 \times 50 mm) 위에 DAPI-벡타실드 용액(DAPI 1: Vectashield(Vector Lab., Inc., USA) 99) 40 μ L를 떨어뜨렸다. 슬라이드 글라스를 뒤집어서 커버 글라스와 붙이고 DAPI 용액이 전체에 퍼질 때까지 기다린 뒤 형광현미경을 이용해서 관찰하였다.

7. 사진 촬영 및 핵형 분석

좋은 상(spreading)은 형광현미경에 부착된 CCD 카메라(Leica DFC 365 FX, Germany)를 이용해 1,000배로 사진 촬영을 하였다. 사진의 분석은 Cytovision[®]/Genus[™] 7.2(Applied Imaging, USA) 프로그램을 사용하였고 사진의 편집은 Adobe Photoshop CS6(Adobe, USA)으로 사용하였다. 가장 좋은 상을 선정해서 염색체의 길이와 45S rDNA locus, 5S rDNA locus를 분석하되, 다른 상도 참고해서 신뢰도를 높였다. 염색체의 형태는 Levan et al. (1964)의 방법에 따랐으며, 염색체의 번호는 형태 별로 나눈 다음 길이 순으로 정렬하되 모양을 참고하여 짝을 만들었다.

제4장 결 과

1. 사시나무의 핵형

사시나무의 중기 염색체 중에서 가장 좋은 상을 선정하여 사진을 촬영하였다. 형광현미경 필터별로 촬영한 사진과 합성한 사진을 Figure 5에 나타내었으며, 각각의 염색체에 번호를 붙이고 길이, 형태를 측정하여 Table 1에 나타내었다. 염색체의 길이를 측정할 때, 인형성 부위의 길이는 가변성이 크기 때문에 측정에서 제외하였다. 상동염색체를 짝지어서 Figure 9의 A에 크기순으로 번호를 붙여 나열하였다.

사시나무는 기존에 알려진 대로 총 38개의 염색체를 가지고 있었으며, 한 쌍이 상동염색체를 이루는 2배체($2n = 38$)인 것으로 나타났다. 염색체 길이의 범위는 $1.45 \sim 4.69 \mu\text{m}$ 였고 총 염색체 길이는 $42.91 \mu\text{m}$ 였다. 중부염색체(m)가 총 28개, 차중부염색체(sm)가 총 6개, 차단부염색체(st)가 총 4개로 나타났다. 이를 정리한 핵형식(karyotypic formula)은 $2n = 28m + 6sm + 4st$ (2sat)로 나타낼 수 있었다.

45S rDNA와 5S rDNA 탐침을 이용한 FISH 분석을 실시한 결과, 한 쌍의 45S rDNA locus가 6번 염색체의 단완에서 관찰되었고, 한쌍의 5S rDNA locus가 9번 염색체의 단완에서 관찰되었다. 특히 45S rDNA locus의 경우 희미하게 DAPI 염색된 인형성 부위(nucleolar organizing region; NOR)로 나타났다. 따라서 6번 염색체는 부수염색체(satellite chromosome)로 판명되었다. Figure 5 외에도 3개의 세포상에서도 동일한 개수의 45S rDNA locus와 5S rDNA locus를 확인할 수 있었고 3개 상 모두에서 45S rDNA locus는 인형성 부위로 나타났다.

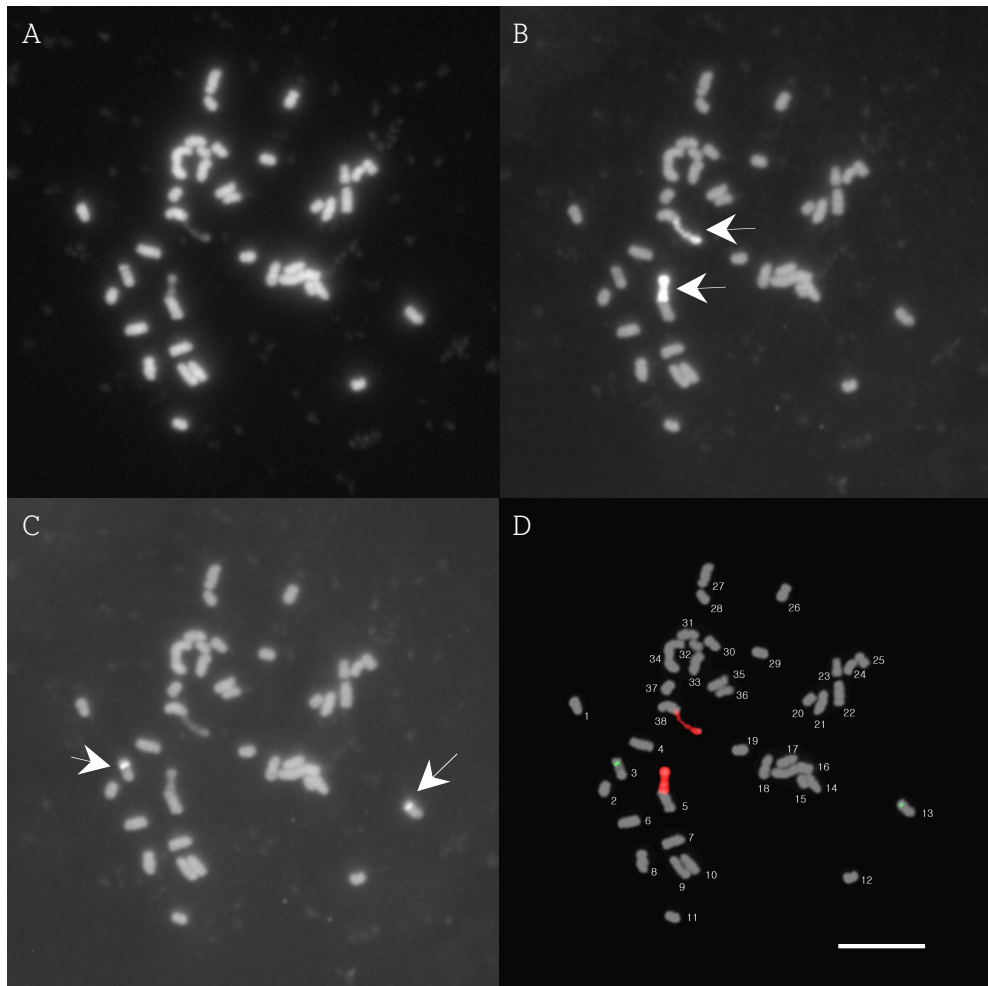


Figure 5. FISH and DAPI staining of metaphase chromosomes in *Populus tremula* var. *davidiana*. (A) DAPI staining, (B) FISH by 45S rDNA probe. Arrows indicate 45S rDNA locus, (C) FISH by 5S rDNA probe. Arrows indicate 5S rDNA locus, and (D) Overlapped picture of DAPI staining and FISH. Numbers are randomly designated. Red fluorescences are 45S rDNA signals, and green fluorescence are 5S rDNA signals. Bar is 10 μm .

Table 1. Karyotype data of *Populus tremula* var. *daurica*

Chromosome number	Total length (μm)	Long arm length (μm)	Short arm length (μm)	Arm ratio	Type*
1	4.69	2.88	1.81	1.59	m
2	2.72	2.10	0.62	3.39	st
3	2.69	1.79	0.90	1.99	sm
4	2.67	1.84	0.83	2.22	sm
5	2.61	1.36	1.25	1.09	m
6	2.55	1.99	0.56	3.55	st(sat)
7	2.48	1.72	0.76	2.26	sm
8	2.44	1.40	1.04	1.35	m
9	2.40	1.26	1.14	1.11	m
10	2.35	1.29	1.06	1.22	m
11	2.05	1.17	0.88	1.33	m
12	1.96	1.13	0.83	1.36	m
13	1.83	1.02	0.81	1.26	m
14	1.71	0.94	0.77	1.22	m
15	1.64	0.87	0.77	1.13	m
16	1.60	0.81	0.79	1.03	m
17	1.56	0.83	0.73	1.14	m
18	1.51	0.86	0.65	1.32	m
19	1.45	0.83	0.62	1.34	m
Total	42.91	26.09	16.82		

* m; metacentric, sm; submetacentric, st; subtelomeric, (sat); satellite chromosome

2. 은백양의 핵형

은백양의 중기 단계에 있는 세포 중에서 핵형을 가장 잘 파악할 수 있는 상을 사진 촬영하여 Figure 6에 나타내었다. 그리고 염색체 별로 길이와 형태를 측정하여 Table 2에 나타내었고, 인형성 부위의 길이는 측정하지 않았다. 마지막으로 상동염색체를 크기순으로 나열하여 Figure 9의 B에 나타내었다.

은백양의 총 염색체 길이는 $47.92\ \mu\text{m}$ 로 나타났고 염색체 길이의 범위는 $1.37\sim 5.03\ \mu\text{m}$ 로 나타났다. 기존에 보고된 바와 같이 $2n = 38$ 개의 핵형을 가지고 있었다. 중부염색체가 총 26개, 차중부염색체가 총 10개, 차단부염색체가 총 2개로 나타났고 핵형식은 $2n = 26m + 10sm (2sat) + 2st$ 로 나타났다.

FISH를 실시한 결과, 45S rDNA locus가 5번 염색체의 단완에서 1쌍이 관찰되었고, 5S rDNA locus가 9번 염색체의 단완에서 1쌍이 관찰되었다. 5번 염색체의 45S rDNA locus는 DAPI 염색이 희미하게 되어있는 인형성 부위로서 길게 연장되어 있는 형태였다. 따라서 5번 염색체는 부수염색체로 판별되었다. 다른 세포 중 FISH 결과를 관찰할 수 있는 5개 세포에서도 동일한 45S rDNA locus 개수와 5S rDNA locus 개수를 확인 할 수 있었다. 마찬가지로 5개 상 모두에서 45S rDNA locus는 인형성 부위로 나타났다.

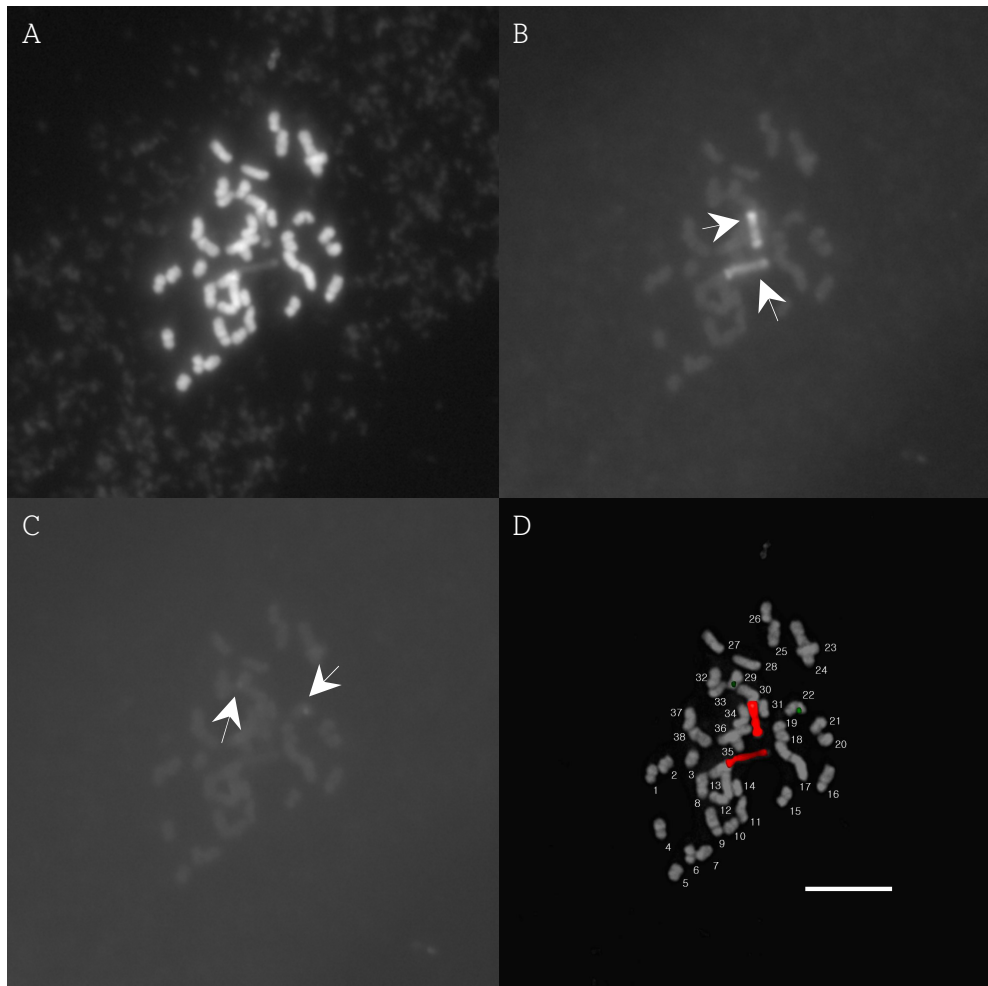


Figure 6. FISH and DAPI staining of chromosomes in *Populus alba*. (A) DAPI staining, (B) FISH by 45S rDNA probe. Arrows indicate 45S rDNA locus, (C) FISH by 5S rDNA probe. Arrows indicate 5S rDNA locus, and (D) Overlapped picture of DAPI staining and FISH. Numbers are randomly designated. Red fluorescences are 45S rDNA signals and green fluorescences are 5S rDNA signals. Bar is 10 μm .

Table 2. Karyotype data of *Populus alba*

Chromosome number	Total length (μm)	Long arm length (μm)	Short arm length (μm)	Arm ratio	Type*
1	5.03	2.98	2.05	1.45	m
2	4.52	3.14	1.38	2.28	sm
3	3.05	2.12	0.93	2.28	sm
4	2.95	1.57	1.38	1.14	m
5	2.89	2.04	0.85	2.40	sm(sat)
6	2.83	1.47	1.36	1.08	m
7	2.66	1.46	1.20	1.22	m
8	2.63	2.05	0.58	3.53	st
9	2.36	1.40	0.96	1.46	m
10	2.30	1.22	1.08	1.13	m
11	2.18	1.20	0.98	1.22	m
12	2.12	1.43	0.69	2.07	sm
13	2.02	1.18	0.84	1.40	m
14	1.96	1.12	0.84	1.33	m
15	1.87	1.01	0.86	1.17	m
16	1.87	1.21	0.66	1.83	sm
17	1.76	1.00	0.76	1.32	m
18	1.55	0.85	0.70	1.21	m
19	1.37	0.73	0.64	1.14	m
Total	47.92	29.18	18.74		

* m; metacentric, sm; submetacentric, st; subtelomeric, (sat); satellite chromosome

3. 수원사시나무의 핵형

수원사시나무의 세포 중 중기 단계의 염색체 중 가장 핵형분석에 용이한 상 1개를 선정하여 Figure 7에 나타내었다. 그리고 각각의 염색체의 길이를 측정하고 형태를 분류하여 Table 3에 나타내었다. 측정 결과를 바탕으로 상동염색체끼리 짝을 지어 크기순으로 나열해 번호를 붙여서 Figure 9의 C에 나타내었다.

수원사시나무의 염색체는 총 38개로 나타났으며, 상동염색체의 개수가 2개인 2배체($2n = 38$)인 것으로 나타났다. 26개의 중부염색체와 12개의 차중부염색체가 존재하여 핵형식은 $2n = 26m + 12sm$ ($2sat$)로 나타났다. 수원사시나무 염색체의 길이는 총 $39.59 \mu m$ 로 측정되었고, 범위는 $1.26 \sim 4.53 \mu m$ 로 나타났다.

FISH에 사용한 rDNA의 탐침에서는 45S rDNA locus와 5S rDNA locus가 각각 1쌍씩 존재하며, 45S rDNA locus는 5번 염색체의 단완에, 5S rDNA locus는 7번 염색체의 단완에 존재하였다. 45S rDNA locus는 인형성 부위였으며, 따라서 5번 염색체는 부수염색체로 판정되었다. Figure 7외에도 중기염색체가 관찰된 세포 12개에 동일한 수의 45S rDNA locus와 5S rDNA locus가 발견되었다.

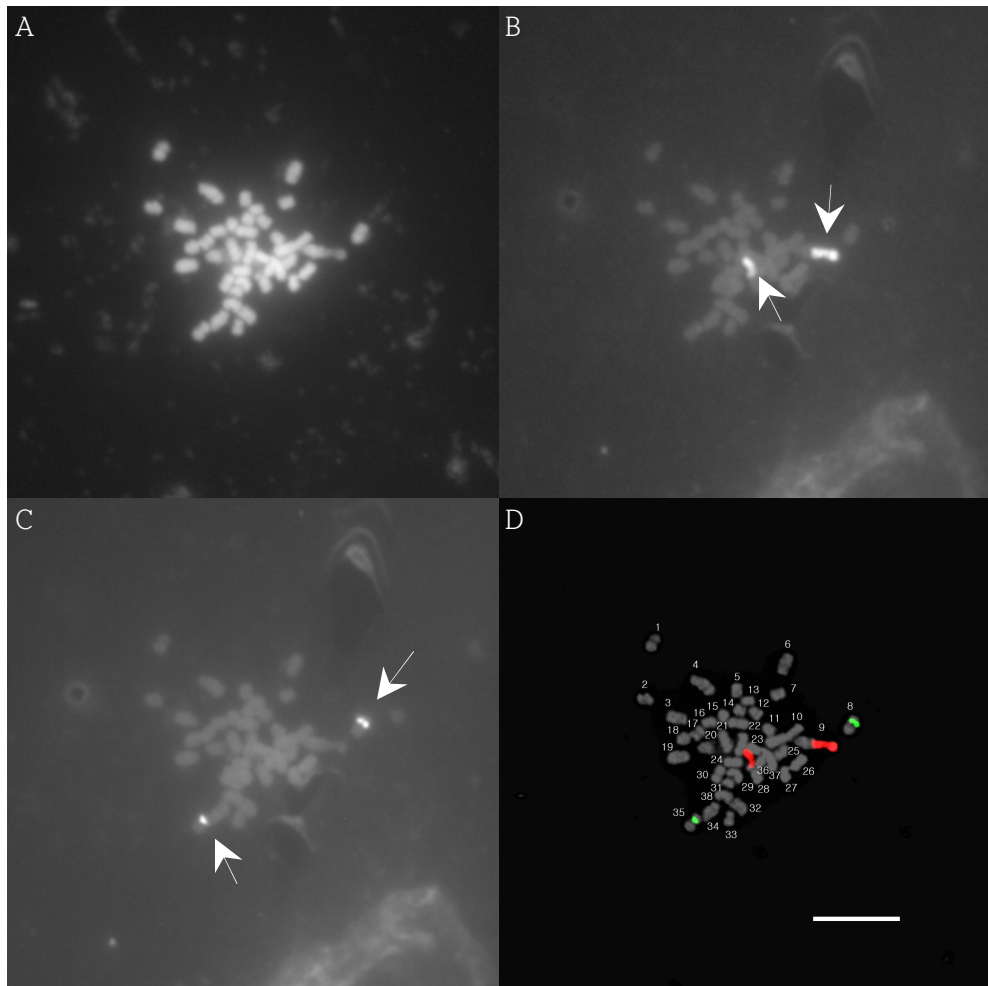


Figure 7. FISH and DAPI staining of chromosomes in *Populus tremula* var. *glandulosa*. (A) DAPI staining, (B) FISH by 45S rDNA probe. Arrows indicate 45S rDNA locus, (C) FISH by 5S rDNA probe. Arrows indicate 5S rDNA locus, and (D) Overlapped picture of DAPI staining and FISH. Numbers are randomly designated. Red fluorescences are 45S rDNA signals and green fluorescences are 5S rDNA signals. Bar is 10 μ m.

Table 3. Karyotype data of *Populus tremula* var. *glandulosa*

Chromosome number	Total length (μm)	Long arm length (μm)	Short arm length (μm)	Arm ratio	Type*
1	4.53	2.54	1.99	1.28	m
2	2.81	1.94	0.87	2.23	sm
3	2.52	1.80	0.72	2.50	sm
4	2.47	1.66	0.81	2.05	sm
5	2.41	1.73	0.68	2.54	sm(sat)
6	2.33	1.54	0.79	1.95	sm
7	2.31	1.24	1.07	1.16	m
8	2.24	1.29	0.95	1.36	m
9	2.09	1.17	0.92	1.27	m
10	2.08	1.42	0.66	2.15	sm
11	1.79	1.04	0.75	1.39	m
12	1.61	0.94	0.67	1.40	m
13	1.61	0.91	0.70	1.30	m
14	1.59	0.82	0.77	1.06	m
15	1.56	0.87	0.69	1.26	m
16	1.55	0.84	0.71	1.18	m
17	1.44	0.85	0.59	1.44	m
18	1.39	0.80	0.59	1.36	m
19	1.26	0.72	0.54	1.33	m
Total	39.59	24.12	15.47		

* m; metacentric, sm; submetacentric, (sat); satellite chromosome

4. 현사시나무의 핵형

Figure 8은 현사시나무 세포 중 중기 염색체가 가장 잘 나온 상을 선정해 촬영한 것이다. 이들 염색체의 길이와 형태를 측정하여 Table 4에 나타내었다. Figure 9의 D는 현사시나무 염색체를 상동염색체 별로 분류하여 크기 순으로 나열해 번호를 붙인 것이다.

분석결과 현사시나무의 염색체 수는 총 38개였으며, 이 중 28개가 중부염색체, 10개가 차중부염색체인 것으로 나타났다. 현사시나무는 상동염색체가 1쌍인 2배체($2n = 38$)였으며, 핵형식은 $2n = 28m + 10sm$ (2sat)인 것으로 나타났다. 현사시나무 염색체의 총 길이는 $50.33 \mu m$ 였으며, 염색체 길이 범위는 $1.56 \sim 5.36 \mu m$ 으로 나타났다.

rDNA 탐침을 위한 FISH 분석을 실시한 결과, 45S rDNA locus는 1쌍이 7번 염색체의 단완에서, 5S rDNA locus는 1쌍이 8번 염색체의 단완에서 나타났다. 45S rDNA locus는 인형성 부위에서 관찰되었으며, 7번 염색체는 부수염색체로 판정되었다. Figure 8 외에 다른 중기 단계의 세포 11개에서 같은 숫자의 45S rDNA locus와 5S rDNA locus가 관찰되었다.

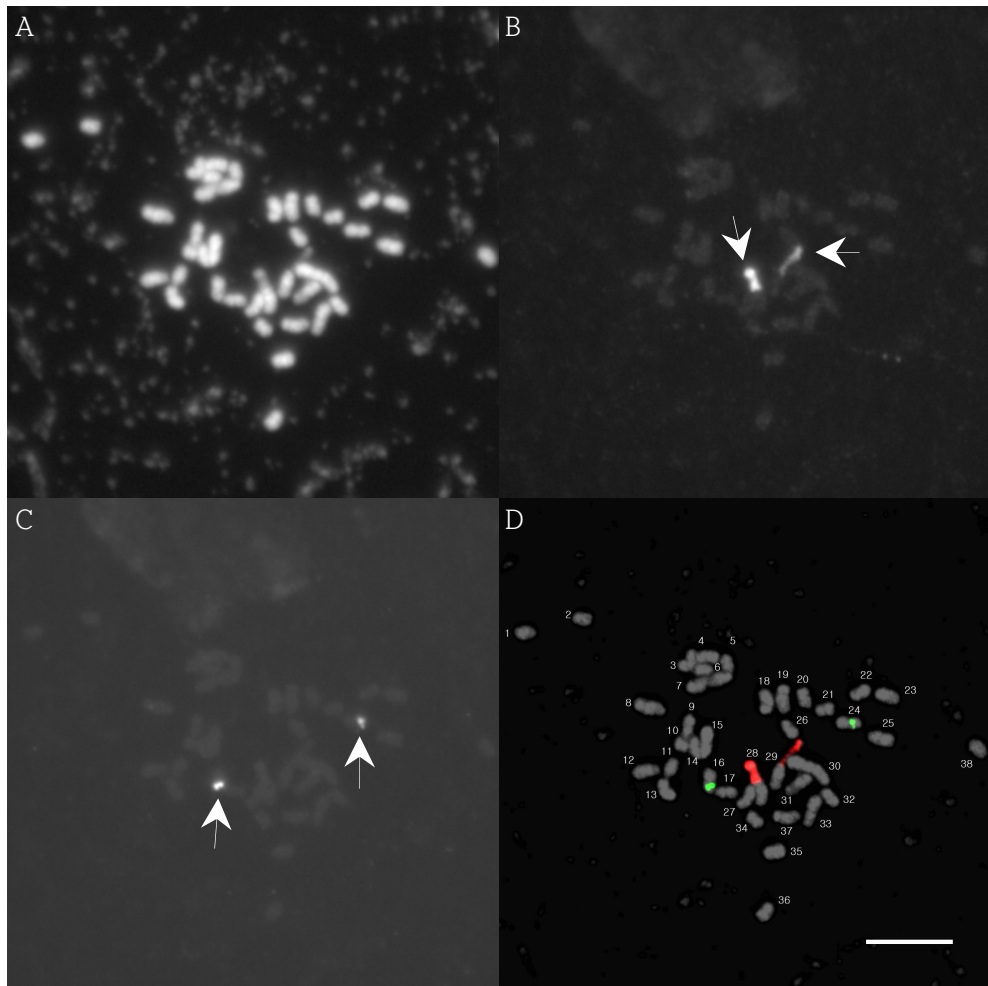


Figure 8. FISH and DAPI staining of chromosomes in *Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*. (A) DAPI staining, (B) FISH by 45S rDNA probe. Arrows indicate 45S rDNA locus, (C) FISH by 5S rDNA probe. Arrows indicate 5S rDNA locus, and (D) Overlapped picture of DAPI staining and FISH. Numbers are randomly designated. Red fluorescences are 45S rDNA signals and green fluorescences are 5S rDNA signals. Bar is 10 μ m.

Table 4. Karyotype data of *Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*

Chromosome number	Total length (μm)	Long arm length (μm)	Short arm length (μm)	Arm ratio	Type*
1	5.36	2.97	2.39	1.24	m
2	3.52	1.89	1.63	1.16	m
3	3.49	2.42	1.07	2.26	sm
4	3.24	2.35	0.89	2.64	sm
5	2.94	2.19	0.75	2.92	sm
6	2.82	1.52	1.30	1.17	m
7	2.78	1.82	0.96	1.90	sm(sat)
8	2.73	1.47	1.26	1.17	m
9	2.53	1.37	1.16	1.18	m
10	2.49	1.55	0.94	1.65	m
11	2.40	1.33	1.07	1.24	m
12	2.32	1.20	1.12	1.07	m
13	2.23	1.49	0.74	2.01	sm
14	2.22	1.16	1.06	1.09	m
15	2.10	1.18	0.92	1.28	m
16	2.00	1.02	0.98	1.04	m
17	1.88	0.97	0.91	1.07	m
18	1.72	0.93	0.79	1.18	m
19	1.56	0.83	0.73	1.14	m
Total	50.33	29.66	20.67		

* m; metacentric, sm; submetacentric, (sat); satellite chromosome

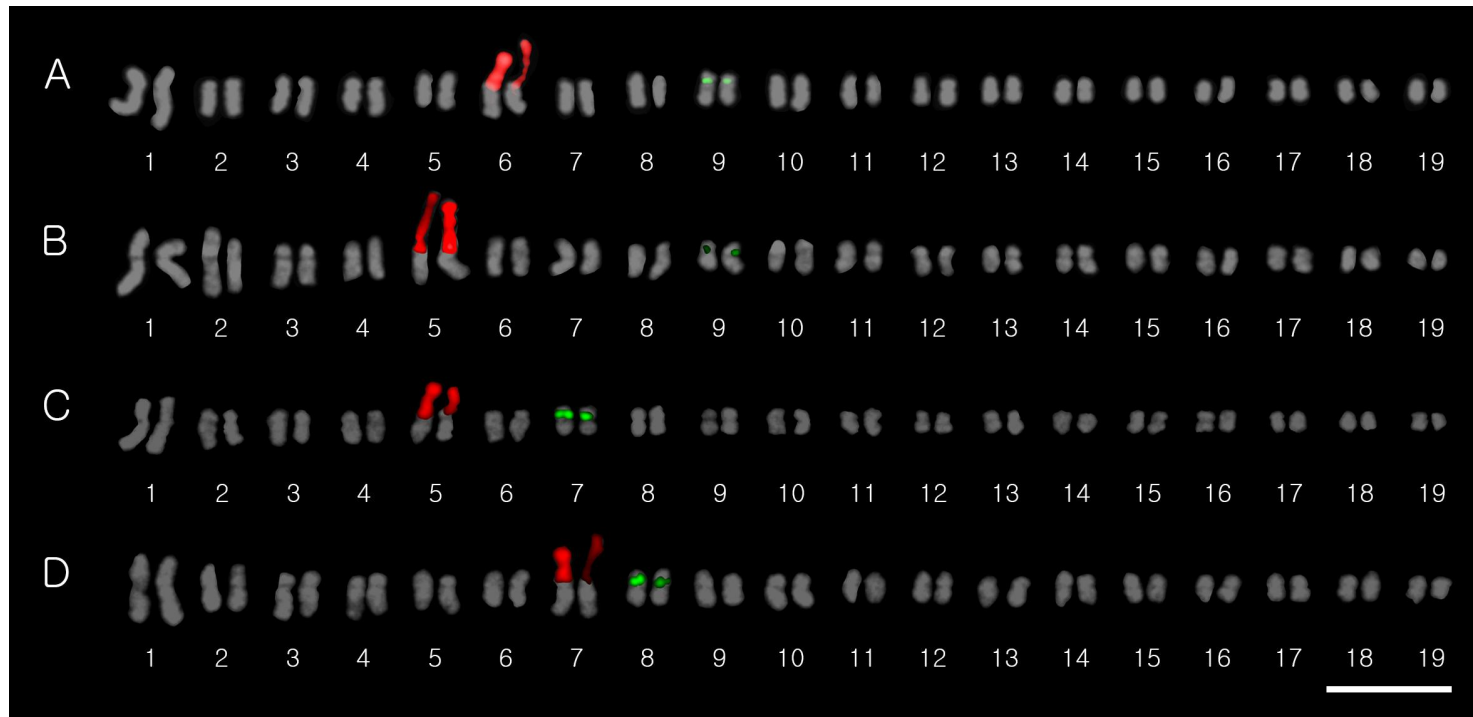


Figure 9. Karyotypic ideograms based on the measurement of chromosome length and morphology and rDNA signals. (A) *Populus tremula* var. *davidiana*, (B) *P. alba*, (C) *P. tremula* var. *glandulosa* and (D) *P. alba* \times *P. tremula* var. *glandulosa*. Red signals indicate 45S rDNA locus and green signals indicate 5S rDNA locus. Bar is 10 μm .

제5장 고 찰

사시나무절 수종들의 핵형을 분석한 결과, 모든 수종이 38개의 염색체를 가지고 있으며 2배체($2n = 38$)라는 것을 확인하였다. 그리고 모든 수종의 염색체가 26~28개의 중부염색체를 가지고 있으며 단부염색체를 가지고 있지 않다는 공통점이 있었다. 1번 염색체의 경우 모든 수종이 $4.53 \sim 5.26 \mu\text{m}$ 의 범위 내 길이를 가지고 있었고, 3~19번 염색체는 모든 수종에서 $3.49 \sim 1.26 \mu\text{m}$ 의 범위를 가지고 있었다. 또한 모든 수종이 1쌍의 45S rDNA locus와 1쌍의 5S rDNA locus를 가지고 있었으며, 45S rDNA locus는 부수염색체의 인형성 부위에 공통적으로 존재하고 있었다. 이러한 공통점들로 미루어볼 때 모든 수종들의 핵형은 유사하다고 판단된다.

45S rDNA locus와 5S rDNA locus의 개수는 모든 수종에서 같았지만, 염색체 번호는 조금씩 달랐다. 45S rDNA locus의 경우 사시나무와 현사시나무에서는 6번 염색체의 단완에 자리하고 있었고 은백양과 수원사시나무는 5번 염색체의 단완에 자리하고 있었다. 5S rDNA locus는 사시나무와 은백양의 9번 염색체의 단완에 존재하고 있었고 수원사시나무는 7번 염색체, 현사시나무는 8번 염색체에 자리 잡고 있었다. 만약 상동 염색체의 번호가 정확히 부여된 것이라면 교차(crossing over)나 염색체 재배치(chromosome rearrangement)가 일어난 것일 수도 있다. 하지만 염색체의 길이는 세포분열의 진행단계에 따라 응축정도가 차이가 있을 수 있기 때문에 오차가 존재할 수 있다(Nkongolo & Mehes-Smith, 2012). 또한 사시나무절의 염색체의 경우 3번 염색체와 그보다 작은 염색체들이 $3.49 \sim 1.26 \mu\text{m}$ 의 범위로 유사한 길이를 가지고 있기 때문에 염

색체 길이로 상동 염색체를 구별하는 것은 어려운 일이다. 따라서 이 경우에는 45S rDNA locus가 위치한 사시나무와 현사시나무의 6번 염색체, 그리고 은백양과 수원사시나무의 5번 염색체가 대응되는 관계라고 봐야 하며, 5S rDNA locus가 위치한 사시나무와 은백양의 9번 염색체, 수원사시나무의 7번 염색체, 현사시나무의 8번 염색체가 대응한다고 해석하는 편이 더 적합하다.

은백양에서 1쌍의 45S rDNA locus가 존재한다는 것은 Prado et al. (1996)이 보고한 바와 동일하다. 사시나무와 수원사시나무, 현사시나무의 45S rDNA locus에 관한 연구는 이번이 처음이다. 사시나무속의 45S rDNA locus의 선행연구를 종합해보면, 미루나무절에 속하는 양버들과 미루나무에서 2쌍, 이태리 포플러에서는 3쌍이 관찰되었고 황철나무절에 속하는 *P. trichocarpa*는 2쌍, 발삼포플러는 3쌍이 관찰되었다(Prado et al., 1996; Islam-Faridi et al., 2009). 현대까지 보고된 45S rDNA locus의 개수를 종합해보면 사시나무절은 1쌍이고 미루나무절과 황철나무절은 2쌍 또는 3쌍이다. 연구된 종의 수가 부족하지만 사시나무속 내의 절에 따라서 45S rDNA locus 개수의 차이가 존재하는 것으로 보이며 앞으로 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

반면 5S rDNA locus의 경우 다른 선행연구(Ribeiro et al., 2008; Islam-Faridi et al., 2009)에서 *P. trichocarpa*과 양버들이 1쌍으로 나타났다. 이번 연구에도 모든 수종의 5S rDNA locus가 1쌍인 것으로 나타난 것으로 미루어보아, 사시나무속은 5S rDNA locus가 1쌍일 수 있다는 가설을 세워볼 수 있지만 아직까지 연구된 종의 수가 부족하기 때문에 추가연구가 필요하다.

2번 염색체의 경우 은백양이 4.52 μm , 현사시나무가 3.52 μm , 수원사시

나무가 2.81 μm , 사시나무가 2.72 μm 로 큰 차이를 보였다. 일단 은백양과 사시나무의 2번 염색체 길이 차이가 가장 크다. 그리고 수원사시나무의 2번 염색체 길이는 은백양과 사시나무의 사이에 위치하지만 사시나무쪽에 가까운데, 장진성 등(2011)이 주장한 것처럼 수원사시나무가 은백양과 사시나무의 교잡종이며 그 중에서도 사시나무에 좀 더 가까운 편이라고 볼 수 있다. 그리고 현사시나무의 2번 염색체 길이는 은백양과 수원사시나무의 중간 길이를 가지고 있다. 이러한 길이변화는 은백양과 수원사시나무가 교잡되면서 그 중간 길이를 가지게 된 것으로 보인다.

Liwang et al. (2005)는 사시나무의 핵형식을 $2n = 26m (1\text{sat}) + 6sm + 6st (1\text{sat}) + 2t$ 로 나타내었고, 은백양은 $2n = 31m + 4sm (1\text{sat}) + 1st (1\text{sat}) + 2t$ 로 밝혔다. 전체 염색체 수와 부수염색체의 수는 이번 연구와 일치하지만, 염색체 분류에 있어서는 조금 차이를 보였다. 사시나무의 경우 이번 연구에서 중부염색체가 2개 더 나타나는 대신 차중부염색체가 2개 더 적게 나타났다. 또한 은백양은 이번 연구에서 중부염색체가 5개 적게, 단부염색체가 2개 적게 나온 대신 차중부염색체가 6개, 차단부염색체가 1개 더 나타났다. 이는 측정의 오차이거나 개체 간의 차이일 수 있다. 특히 Liwang et al. (2005)은 FISH를 활용하지 않았으며 사진 자료를 볼 때 해상도가 떨어져서 정확도가 부족해 보인다. 특히 동원체의 위치에 따른 형태분류에서 짝이 없는 홀수로 나뉘지는 점, 상동염색체로 묶여야 할 부수염색체가 다른 형태로 분리된다는 점에서 이번 연구가 좀 더 높은 정확도를 가진다고 판단해볼 수 있다.

사시나무절에 속한 사시나무와 은백양, 수원사시나무와 현사시나무는 핵형 분석에서 몇 가지 다른 점이 있었지만, 모두 2배체에 염색체 개수가 38개라는 점, 그리고 45S rDNA locus, 5S rDNA locus의 개수가 1쌍

이라는 점 등에서 핵형이 유사하다고 결론지을 수 있었다. 사시나무와 은백양, 그리고 수원사시나무와 은백양이 교잡에 성공했던 이유는 이처럼 핵형이 유사하기 때문으로 보인다.

앞으로 다른 사시나무속의 다른 절들의 핵형을 연구하면, 교잡이 불가능한 절간의 핵형차이와 교잡이 가능한 절간의 핵형차이를 분석해서 교잡과 핵형의 관계에 대해서 더 깊이 연구할 수 있을 것이다. 또한, 이번 연구결과를 기초로 하여, 그동안 진행된 사시나무속의 유전학적 연구, 유전체 연구 성과를 새로운 탐침으로 사용하여 FISH를 수행한다면, 물리적 지도를 작성하여 유전학적 연구는 물론 사시나무속 육종에 큰 도움이 될 것이다.

인용문헌

- 구영본, 여진기, 신한나, 정성호. 2010. 포플러. 국립산림과학원. 서울.
13-21 pp., 68-60 pp., 72-74 pp.
- 김수영. 2011. 멸종위기 및 주요 생물자원의 염색체 연구(II). 국립생물자원관. 인천. 1-3 pp.
- 김수영, 김민하, 김진석. 2012. 한반도 자생식물의 염색체자료집 발간. 국립생물자원관. 인천. 14-17 pp.
- 김수영, 김찬수. 2009. 핵형분석과 FISH 기술을 이용한 솔비나무와 다른 나무의 세포유전학적 연구. 한국식물분류학회지, 39(3): 193-198.
- 김수인. 1988. 소나무속 12 수종의 (樹種) 염색체 핵형분석에 관한 연구. 한국임학회지, 77(1): 53-64.
- 노은운, 이효신, 이재순, 최영임, 한무석. 2008. 포플러의 유전공학 II. 국립산림과학원. 서울. 7-9 pp.
- 세포유전학 편찬위원회. 2011. 진단세포유전학. 2판. 범문에듀케이션. 서울. 277-283 pp.
- 손두식, 황재우, 최장옥, 하가영, 서재덕. 1994. 형태적 특성에 의한 수원 사시나무의 잡종성. 한국육종학회지, 26(2): 105-110.
- 신준환, 최완용, 구영본, 김태수, 한상억, 유근옥, 강규석, 김인식, 우관수, 탁우식, 김장수, 장경환, 김선창, 정헌관, 이문호, 황석인, 김세현, 김만조, 노은운, 이재순, 안진권, 문홍규, 김용율, 이재천, 홍용표, 박형순, 정미숙, 허성두. 2006. 임목육종 50년. 국립산림과학원. 서울. 11-71 pp.
- 우관수, 여진기, 구영본, 김태수. 2005. 속성수 신품종 육성현황. 국립산림

- 과학원, 서울. 3-6 pp. 22-23 pp.
- 장진성. 2014. 올바른 포플러 학명 사용. 포플러, 28: 43-48.
- 장진성, 김휘, 장계선. 2011. 한국동식물도감 제 43권 식물(수목)편. 디자인포스트. 파주. 54-56 pp.
- 주경웅, 김윤식. 2006. 세포유전학. 고려의학. 서울. 11-12 pp.
- Anamthawat-Jónsson, K. 2004. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and *in situ* hybridization. Methods Cell Sci 25: 91 - 95.
- Arrigucci, R., Bushkin, Y., Radford, F., Lakehal, K., Vir, P., Pine, R., Martin, D., Sugarman, J., Zhao, Y., Yap, G. S., Lardizabal, A. A., Tyagi, S., Gennaro, M. L. 2017. FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. Nature Protocols, 12(6): 1245-1260.
- Benabdelmouna, A., Abirached-Darmency, M. 1997. Distribution and chromosomal organization of 18S-5.8 S-25S and 5S rDNA in *Petunia* species. Agronomie, 17(6-7): 349-360.
- Bradshaw, H. D., Ceulemans, R., Davis, J., Stettler, R. 2000. Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. Journal of Plant Growth Regulation, 19(3) : 306-313.
- Cai, Q., Zhang, D., Liu, Z.-l., Wang, X.-R. 2006. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. Ann Bot 97 : 715 - 722.

- Castilho, A., Heslop-Harrison, J. S. 1995. Physical mapping of 5S and 18S - 25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome*, 38(1): 91-96.
- Cervera, M. T., Storme, V., Soto, A., Ivens, B., Van Montagu, M., Rajora, O. P., Boerjan, W. 2005. Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7): 1440-1456.
- Danilova, T. V., Birchler, J. A. 2008. Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. *Chromosoma*, 117(4): 345-356.
- Dickmann, E. I. (2001). An overview of the genus *Populus*. Poplar culture in north America. NCR Research Press. Ottawa. 397 pp.
- D'hont, A., Ison, D., Alix, K., Roux, C., Glaszmann, J. C. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, 41(2): 221-225.
- Eckenwalder, J. E. 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In Stettler, R. F., Bradshaw, H. D., Heilman, P. E. Hinckley, T. M. (Eds.), *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press, Ottawa.
- FAO. 1980. Poplars and willows in wood production and land use. FAO Forestry Series No. 10, 328 pp.

- Fu, L. K., Chen, T. Q., Lang, K. Y., Tao, H., Qi, L. 2001. Higher Plants of China. Qingdao Publishing House, Qingdao.
- Hasterok, R., Jenkins, G., Langdon, T., Jones, R. N., & Maluszynska, J. 2001. Ribosomal DNA is an effective marker of Brassica chromosomes. Theoretical and Applied Genetics, 103(4): 486-490.
- Islam-Faridi, M. N., Nelson, C. D., DiFazio, S. P., Gunter, L. E., Tuskan, G. A. 2009. Cytogenetic analysis of *Populus trichocarpa* - ribosomal DNA, telomere repeat sequence, and marker-selected BACs. Cytogenetic and genome research, 125(1): 74-80.
- Jackson, S. A., Wang, M. L., Goodman, H. M., Jiang, J. 1998. Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. Genome, 41(4): 566-572.
- Jürgen, S.-S. 1980. Cytogenetics : plants, animals, humans. Springer. New York. 32-42 pp.
- Kapuscinski, J. 1995. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. Biotechnic & Histochemistry. 70(5): 220-233.
- Kato, A. 1999. Air drying method using nitrous oxide for chromosome counting in maize. Biotechnic & histochemistry, 74(3): 160-166.
- Kato, A., Lamb, J. C., Birchler, J. A. 2004. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

- America, 101(37): 13554–13559.
- Kim, S. Y., Lee, J. K. 2007. Karyotype Analysis and Physical Mapping of rDNAs Using Bicolor-FISH in *Tiarella polyphylla* D. Don. Korean Journal of Plant Resources, 20(5): 446–450.
- Koo, Y. B., Yeo, J. K., Woo, K. S., Kim, T. S. 2007. Selection of superior clones by stability analysis of growth performance in *Populus davidiana* Dode at age 12. Silvae Genetica, 56(1–6): 93–101.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52(2): 201–220.
- Levsky, J. M., Singer, R. H. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. Journal of cell science, 116(14): 2833–2838.
- Liwang, Q., Shougong, Z., Suying, H., Chengbin, C., Xiulan, L., Wenqin, S., Ruiyang C., Jianzhong R., Yuquan, Z. 2005. Karyotype analysis of section *Populus* in *Populus*. Acta Horticulturae Sinica, 32(5): 849.
- Löve, A., Löve, D. 1956. Cytotaxonomical conspectus of the Icelandic flora. Acta Horti Gotoburgensis, 20: 65–291.
- Murray, B., Friensen, N., Heslop-Harrison, J. 2002. Molecular cytogenetic analysis of *Podocarpus* and comparison with other gymnosperm species. Ann Bot 89: 483 - 489.
- Nkongolo, K. K., Mehes-Smith, M., 2012. Karyotype evolution in the Pinaceae: implication with molecular phylogeny. Genome

55(10): 735–753.

- Ribeiro, T., Barão, A., Viegas, W., Morais-Cecíli, L. 2008. Molecular cytogenetics of forest trees. *Cytogenetic and genome research*, 120(3–4): 220–227.
- Pardue, M. L., Gall, J. G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168(3937): 1356–1358.
- Prado, E. A., Faivre-Rampant, P., Schneider, C., Darmency, M. A. 1996. Detection of a variable number of ribosomal DNA locus by fluorescent *in situ* hybridization in *Populus* species. *Genome*, 39(5): 1020–1026.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9): 2934–2938.
- Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., Heslop-Harrison, J. S. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 64(3): 315–324.
- Siljak-Yakovlev, S., Cerbah, M., Coulaud, J., Stoian, V., Brown, S., Zoldos, V., Jelenic, S., Papes, D. 2002. Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theor Appl Genet* 104: 505 - 512.
- Shibata, F., Matsusaki, Y., Hizume, M. 2016. A comparative analysis of multi-probe fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) karyotypes in 26 *Pinus* species (Pinaceae). *Cytologia*, 81(4): 409–421.

- Shougong, Z., Liwang, Q. I., Suying, H., Chengbin, C., Xiulan, L., Wenqin, S., Ruiyang, C. 2005. Karyotype comparison of *Aigeiros* species in *Populus*. *Acta Hort Sin*, 32(1): 70.
- Son, D. S., Yim K. B. 1979. Identification of leaf characteristics from various crosses in relation with *Populus glandulosa* U. Jour. of Kor. For. Society 45: 1-10
- Son, D. S., Ha, K. A., Seo, J. D., Hwang, J. W., Choi, C. O. 1994. Hybridity based on morphological characteristics for *Populus glandulosa* uyeki. *Korean Journal of Breeding*. 26(2): 105-110.
- Tagashira, N., Kondo, K. 2001. Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Syst Evol* 227: 145 - 155.
- Taylor, G. A. I. L. 2002. *Populus*: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree?. *Annals of Botany*, 90(6): 681-689.
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L.,

Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D., 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793): 1596-1604.

- Uyeki, H. 1925. Some new variatics of Korean ligneous plants and their value from the standpoint of arboriculture. *Bulletin of the Agr. and For. College, Korea* 1: 6-7.
- Vischi. M., Jurman, I., Bianchi, G., Morgante, M. 2003. Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH. *Theor Appl Genet* 107: 591 - 597.
- Waminal, N. E., Kim, H. H. 2012. Dual-color FISH karyotype and rDNA distribution analyses on four Cucurbitaceae species. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 53(1): 49-56.

- Waminal, N. E., Prellerin, R. J., Kim N. S., Jayakodi M., Park J. Y., Yang T. J., Kim H. H. 2016. Rapid and Efficient FISH using Pre-Labeled Oligomer Probes. (in submission)
- Wilson, E. B. 1925. Cell In Development And Heredity, 3rd. Rev. Macmillan Company.; New York. 1232 pp.
- Xin, H., Lan, Y., Shi, J., Ma, Y., Xi, M. 2016. Pachytene chromosome preparation in *Populus deltoides* Marsh. Curr. Protoc. Plant Biol. 1: 566–573.
- Yamamoto, M., Mukai, Y. 1989. Application of fluorescence *in situ* hybridization to molecular cytogenetics of wheat. Wheat Information Service, 69: 30–32.
- Zoldos, V., Papes, D., Cerbah, M., Panaud, O., Besendorfer, V., Siljak-Yakovlev, S. 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. Theor Appl Genet 99: 969 - 977.
- Zhang, Y., Zhang, S. G., Qi, L. W., Liu, B., Gao, J. M., Chen, C. B., Li, X. L., Song, W. 2005. Chromosome microdissection, cloning and painting of the chromosome 1 in poplar (*Populus tremula*). Silvae Genetica, 54(1–6): 211–217.

ABSTRACT

FISH karyotype analysis of *Populus* sect. *Leuce* Duby in Korea

Yang Gil Kim

Forest Environmental Science

Department of Forest Sciences

The Graduate School

Seoul National University

The trees of genus *Populus* represent excellent growth and fast asexual reproduction. Therefore they are harvested to reproduce a large amount of biomass in forestry. And genus *Populus* is easy to cultivate *in vivo* and the size of the whole genome is relatively small. Therefore, their genetic characteristics have been well studied and the whole genome of the one species of the genus has been sequenced completely. However, their cytogenetic studies are limited. In this

study, karyotypes of the species and hybrids of Korean *Populus* section *Leuce* (*P. tremula* var. *davisciana*, *P. alba*, *P. tremula* var. *glandulosa*, *P. alba* × *Populus tremula* var. *glandulsa*.) have been analysed using 45S rDNA and the 5S rDNA probes. For collecting fresh root sample, root cuttings have been collected from the sample trees in the demonstration forest, Hwaseong Suwon, Kyonggi province. After 8-hydroxyquinoline solution fixation on root samples, cells were pre-treated to prepare the specimens. And they were examined by DAPI (4',6-diamidino- 2-phenylindole) and FISH (fluorescence *in situ* hybridization) using 45S rDNA and 5S rDNA probes. As the results, all species and hybrids were diploids ($2n = 38$) and had 38 chromosomes. The karyotype formula of *P. tremula* var. *davisciana* was $2n = 28m + 6sm + 4st$ (2sat), and that of *P. alba* was $2n = 26m + 10sm$ (2sat) + 2st. And the karyotype formula of *P. tremula* var. *glandulosa* was $2n = 26m + 12sm$ (2sat), and that of *P. alba* × *Populus tremula* var. *glandulsa* was $2n = 28m + 10sm$ (2sat). The total length and the length range of the chromosomes of *P. tremula* var. *davidicana*, *P. alba*, *P. tremula* var. *glandulosa*, and *P. alba* × *Populus tremula* var. *glandulsa* were 42.91 μm , 1.45~4.69 μm ; 47.92 μm , 1.37~5.03 μm ; 39.59 μm , 1.26~4.53 μm ; 50.33 μm , 1.56~5.36 μm ; respectively. As the result of FISH, all species had one pair of 45S rDNA locus and one pair of 5S rDNA locus on the short arm parts of chromosomes. And 45S rDNA locus was found on nucleolar organizer regions of satellite chromosomes. Karyotypes of the species of Korean *Populus* section *Leuce* were similar each other, showing

that they have many common characteristics. This similarity of karyotype could be a reason for success of natural hybridization between *P. alba* and *P. tremula* var. *daurica* and artificial hybridization between *P. alba* and *P. alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*. In case of the length of chromosome No 2., *P. alba* was 4.52 μm, *P. alba* × *P. tremula* var. *glandulosa* was 3.52 μm, *Populus tremula* var. *glandulosa* was 2.81 μm, and *P. tremula* var. *daurica* was 2.72 μm. This difference could be caused from the hybridization. These results would be fundamental information for breeding and genetic studies on section *Leuce*, and also help to make genetic map. As further studies, karyotypes of hybrids which had not been completed here should be identified, and also species of other sections should be checked too.

Keywords : Section *Leuce*, *Populus tremula* var. *daurica*, *Populus alba*, karyotype analysis, fluorescence *in situ* hybridization, rDNA probe

Student number : 2016-21456